动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 56−61 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01056

应用改良流式法检测猕猴和食蟹猴体内血型抗体水平的分布情况

张 弛[1], 王筱啸[1], 王 璐[1], 向 莹[1], 魏 晴[2], 王婉瑜[3], 熊郁良[3], 陈 实[1], 陈 刚[1,*]

(1. 华中科技大学 同济医学院附属同济医院器官移植研究所, 器官移植教育部重点实验室, 卫生部器官移植重点实验室, 湖北 武汉 430030; 2. 华中科技大学 同济医学院附属同济医院血库, 湖北 武汉 430030; 3. 中国科学院昆明动物研究所 动物毒素室, 云南 昆明 650223)

摘要：绝大部分灵长类动物存在与人类相似的 ABO 血型系统, 该研究采用改良流式法(flow cytometry method, FCM)检测猕猴及食蟹猴血清中血型抗体水平的分布情况。以流式细胞术为基础, 使用商品化人源红细胞为靶细胞, 并通过加入特异性荧光标记的抗人 IgM 或 IgG 二抗, 对收集的实验用猕猴及食蟹猴的血清样本进行检测, 以人类健康受试者的血清样本为对照, 比较两者血型抗体水平的差异。结果显示：预先用人 O 型浓缩红细胞吸附猴血清中所含种属间非特异性抗体后, FCM 法能够准确检测其血型抗体水平及分型, 并且发现猴血清中天然血型抗体的水平明显低于健康人(P<0.05)。由此得出：通过预处理清除非特异性抗体的干扰后, FCM 法同样适用于灵长类动物血清中血型抗体的检测, 也为构建灵长类动物模拟人 ABO 血型不合器官移植模型提供了技术保障和实验数据。

关键词：流式检测法; ABO 血型抗体; 猕猴；食蟹猴
中图分类号：R-332; Q959.848 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0056-06

Application of flow cytometry to detect ABO blood group antibody levels in rhesus monkeys and cynomolgus monkeys

ZHANG Chi[1], WANG Xiao-Xiao[1], WANG Lu[1], XIANG Ying[1], WEI Qing[2], WANG Wan-Yu[3], XIONG Yu-Liang[3], CHEN Shi[1], CHEN Gang[1,*]

(1. *Institute of Organ Transplantation*, *Tongji Hospital*, *Tongji Medical College*, *Huazhong University of Science and Technology*, *Key Laboratory of Organ Transplantation*, *Ministry of Education, Key Laboratory of Organ Transplantation*, *Ministry of Health*, *Wuhan* 430030, *China*;
2. *Blood Bank of Tongij Hospital*, *Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan* 430030, *China*;
3. *Kunming Institute of Zoology*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*)

Abstract: Similar to humans, most of non-human primates also contain the ABO blood group system. In this study, we sought to evaluate the ABO antibody (Ab) levels in monkeys using a modified flow cytometry method (FCM). The standard commercial human A or B-red blood cells (RBCs) were used as target cells. The binding of target cells and anti-A or B blood group Ab in sera of rhesus or cynomolgus monkeys was detected by flow cytometry after adding secondary specific fluorescence-labeled anti-human IgG or IgM Ab. Human healthy blood donor sera were used as controls. The results revealed that, using clear monkey sera, which were pre-absorbed on normal human type O RBCs to remove non-specific anti-human Abs, the modified FCM gave an accurate detection of ABO Ab levels in monkeys. When compared with the results of human sera, the distribution of ABO Ab levels in monkey sera were significantly lower (P<0.05). We concluded that the modified FCM could be used for the detection of monkey ABO Ab levels. The technique and data will be very valuable for the future establishment of ABO-incompatible organ transplant models in non-human primates, which could improve clinical applications.

Key words: Flow cytometry; ABO blood group antibody; Rhesus monkeys；Cynomolgus monkey

---

收稿日期：2010-12-08; 接受日期：2010-12-30
基金项目：国家自然科学基金面上项目(30872384)
[*]通讯作者(Corresponding author), E-mail: gchen@tjh.tjmu.edu.cn

绝大部分灵长类动物，如狒狒，猕猴，食蟹猴等，也存在与人类相似的ABO血型系统，虽然其外周血红细胞上极少表达A或B血型抗原，但其循环系统中同样可预存一定水平的血型特异性抗体(Terao et al, 1981; Doxiadis et al, 1998)。猕猴及食蟹猴是临床前实验模型中最常用的灵长类动物，其血清内血型天然抗体水平及分布情况尚无明确的报道。灵长类动物的器官移植模型是常用的重要的临床前研究模型，受者循环中的血型天然抗体可能导致血型不合供者器官的体液性损伤，从而显著影响移植物存活(Cooper et al, 1988, 1989)。因此，研究灵长类动物循环中血型天然抗体水平的分布情况具有较为重要的亚临床应用价值。Stussi et al (2005)建立了一种通过流式细胞仪(FCM)来检测人天然血型抗体水平的新方法，我们在其基础上加以改良，并首次应用于灵长类动物，通过对比人类健康受试者，研究了猴血型天然抗体水平的具体分布情况及其与人类对比的差异。

1　材料与方法

1.1　红细胞与血清样本

实验靶红细胞为商品化的人源ABO血型悬浮红细胞，细胞比例相对恒定且表位具有较稳定均一的血型抗原表达量，来源于上海血液生物医药有限责任公司。所有猴或健康受试者的血清样本均与对应分型的靶红细胞结合，以检测血清中预存的天然血型抗体水平。健康猕猴25只 (A型6只, B 型14只, AB型 5只)和食蟹猴24只 (A型8只, B型12只, AB型 4只)分别来源于中国科学院昆明动物研究所实验动物中心和广州蓝岛生物技术有限公司华南灵长类研究开发中心，猕猴体重约 5～10 kg, 食蟹猴体重约 3～5 kg, 均为雄性。52份健康受试者血清样本 (A型16例, B型16例, O型12例, AB型8例)，均来源于本移植中心亲属移植健康供者捐献，男女比例为 50%, 平均年龄为 42 岁(28～55岁)。所有血清均通过标准方法鉴定血型并确定为HIV、HBV、HCV阴性, Rh均为阳性。

新鲜血清样本的采集：使用促凝管采血 5mL, 室温静置2 h, 放置4℃冰箱过夜，可见清亮血清析出，离心10 min (3 800 r/m)，吸取血清分装后放置−80℃冰箱保存备用。

1.2　流式法(FCM法)检测人血清的血型抗体水平

调整红细胞浓度约为 1×10^8 /mL，每管吸取50 μL 与等体积倍比稀释的待测血清混合，轻微振荡后4℃孵育30 min，流式缓冲液(PBS+2%BSA+0.1%叠氮钠)清洗2次，1 000 r/m离心5 min，分别滴加1∶50稀释的、FITC标记的羊抗人IgM或IgG二抗10 μL/管(北京中衫金桥生物技术有限公司), 4℃避光孵育 30 min，再清洗 2 次后添加流式缓冲液300 μL/管，然后采用流式细胞仪检测(FACSAria Becton Dickinson)。为去除非特异性交叉抗体的干扰，AB型混合血清预先与浓缩A和B红细胞孵育后作为阴性对照；O 型混合血清作为阳性对照。检测结果以扣除阴性对照后的几何平均荧光度(Gmean)值来衡量抗体结合水平。为使结果准确可靠，所有检测均重复2次取平均值。

1.3　FCM法检测猴血清的血型抗体

为去除猴血清中可能存在的种属间非特异性抗体的干扰，取200 μL新鲜猴血清标本与100 μL浓缩人O型红细胞混匀后，37℃水浴30 min，900*g* 离心5 min，吸取上清，再次1 200*g* 离心5 min，获取上清，重复吸附1次后获得最终吸附后的猴血清，分装冻存备用。余检测猴血型抗体步骤同1.2节。分别检测吸附前、后猴血清的血型抗体水平，以了解种属非特异性抗体的干扰情况。

1.4　数据统计

所有数据分析使用SPSS17.0。两组血清样本滴度比较采用非参数检验，SD(标准差)作为衡量变异度。采用双向检验, $P<0.05$ 为统计学差异。

2　结　果

2.1　猴的各分型血清在吸附前、后的抗A或抗B抗体的IgM和IgG定性检测情况

通过FCM法检测猴血清标本中最适宜滴度下的抗A及或抗B抗体的阳性情况，并检测抗体水平在血清吸附前后的差异。结果显示，吸附前存在一定的种属间非特异性抗体的干扰，出现低水平的假阳性，吸附后干扰消失。吸附后在B型血清中检测到明显的抗A型红细胞的IgM抗体，而在A和AB型血清中则未检测到上述抗体；在A型血清中检测到明显的抗B型红细胞的IgM抗体，而在B和AB型血清中则未检测到。抗A或B型红细胞的IgG抗体在吸附后的A、B及AB型血清中均未检测到(图1)。

2.2　猴血清中种属间非特异性抗体对血型抗体的半定量检测的干扰

采用人 O 型浓缩红细胞预先吸附处理猴血清中种属间非特异性抗体, 通过 FCM 法检测吸附前后血清中的血型抗体随血清倍比稀释的荧光强度的变化。图 2 显示一例食蟹猴典型个例的检测结果, 吸附后的猴 07cy05(血型为 B)的抗人 A 型红细胞的 IgM 抗体较吸附前血清有所降低, 但仍保持一定的

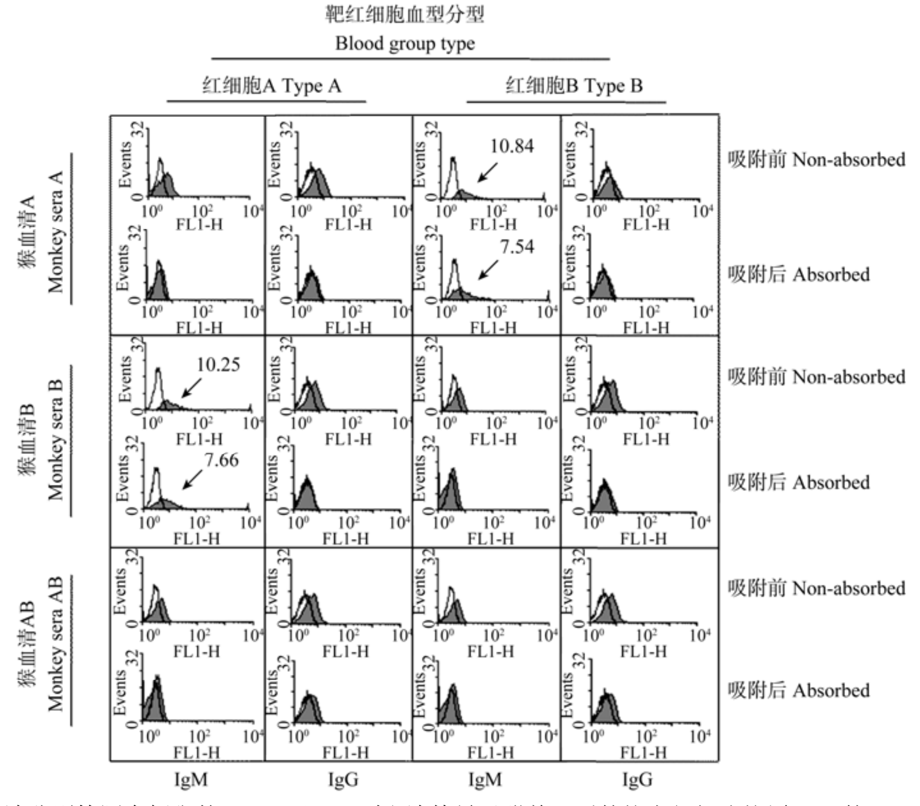


图 1 FCM 法分别检测食蟹猴的 A、B 及 AB 型血清特异吸附前、后的抗人红细胞抗原 A/B 的 IgM 和 IgG 水平

Fig. 1 Measurement of anti-A/B IgM and IgG by FCM in A、B or AB blood group sera in cynomolgus monkeys before and after specific adsorption

透明图：吸附后的猴 AB 型血清与人红细胞表面抗原 A/B 结合(阴性对照); 灰色：填充图为各型猴血清与人红细胞表面抗原 A/B 的结合。

Open histograms represent the staining of the binding of absorbed monkey AB serum with human A or B- RBCs (negative control). The grey filled histograms represent the staining of the binding of the tested monkey sera with human A or B- RBCs.

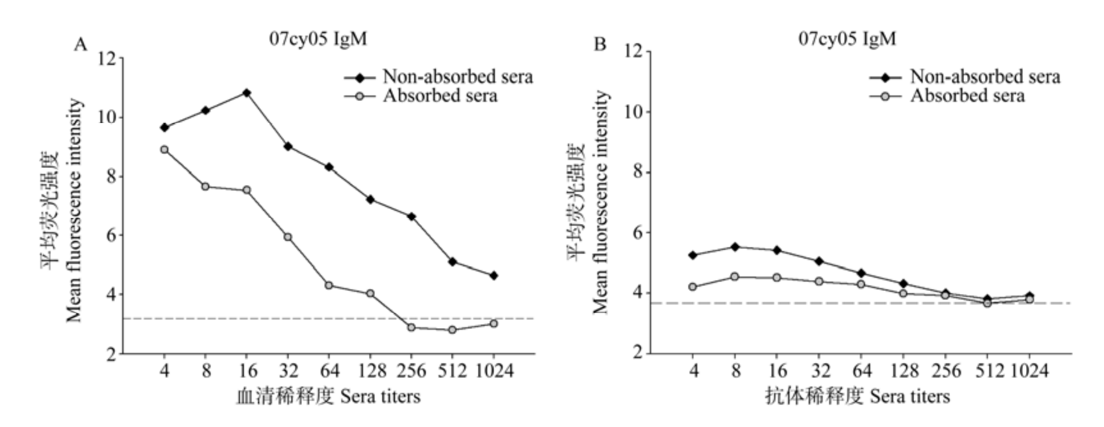


图 2 流式分析显示一例 B 型食蟹猴 (07cy05)血清特异吸附前后的抗 A 抗体 IgM 和 IgG 的变化水平

Fig. 2 Changes of anti-A IgM and IgG levels measured by FCM in a blood group B cynomolgus monkey’s serum (07cy05) before and after specific adsorption

A) 吸附后的抗 A 抗体 IgM 强度略有下降但仍显示一定的阳性水平; B) 抗 A-IgG 抗体在血清吸附处理后基本接近于阴性对照。

A) anti-A IgM levels decreased after specific adsorption of the serum but still kept positive; B)anti-A IgG levels were very closed to negative control after the absorption of the serum.

阳性水平(图 2A)；吸附前血清的血型抗体 IgG 检测出现低水平的阳性情况，而吸附后基本降至阴性水平(图 2B)。而其他猴血清中针对人 A 或 B 型红细胞的抗 A 或 B 抗体水平检测结果与所示典型个例的趋势相似。

2.3　流式法对于猴血清中 ABO 血型抗体滴度的判定

在 FCM 法检测所有猴的血清样本(吸附后)的结果判定中，我们均以检测到的几何平均荧光强度(Gmean)值最早接近或基本达到阴性对照值时的血清倍比稀释度为衡量点，用以判定所检测血清的血型抗体滴度水平(图 3)。此外，为了使判定结果更为准确可靠，在不加血清的单纯阴性对照基础上，加设同例血清针对同型人红细胞反应的自身阴性对照组。如图 3 所示，一例 B 型的食蟹猴血清稀释度在 1∶256 时针对人 A 型红细胞的血型抗体的荧光强度水平非常接近两组阴性对照，故判定该例血清中的血型抗体滴度水平为 1∶256(图 3)。

2.4　比较人和猴血清中天然血型抗体滴度水平的分布差异

采用 FCM 法检测收集的全部 52 例健康受试者

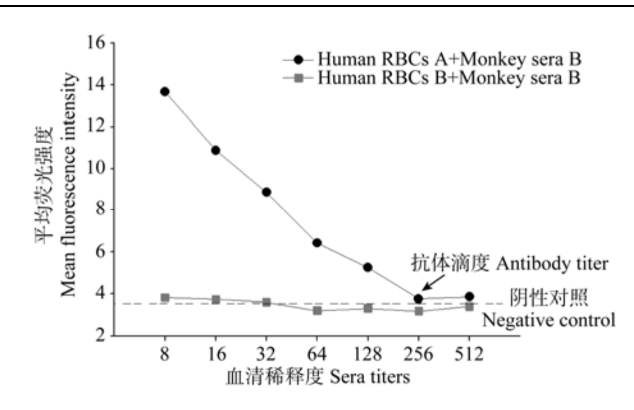


图 3　FCM 法检测一例 B 型食蟹猴血清单样本中随稀释度变化的抗 A-IgM 抗体水平及抗体滴度的判定

Fig. 3　Anti-A IgM levels in doubling diluted sera of a blood group B cynomolgus monkey measured by FCM and the determination of the antibody titer

黑色圆点折线：平均荧光值降低点最接近阴性对照即 1∶256 时为抗体滴度；虚线：单纯阴性对照；灰色方块折线：同例血清针对抗原 B 的自身阴性对照。

The black dot curve showed that the serum dilution (1∶256) was used to represent the anti-A IgM level, at which the mean fluorescence intensity was the first one very closed to the negative control. The dash line represented the negative control without adding the monkey serum. The gray block curve represented the self negative control using the same monkey serum reacted with blood group B human RBCs.

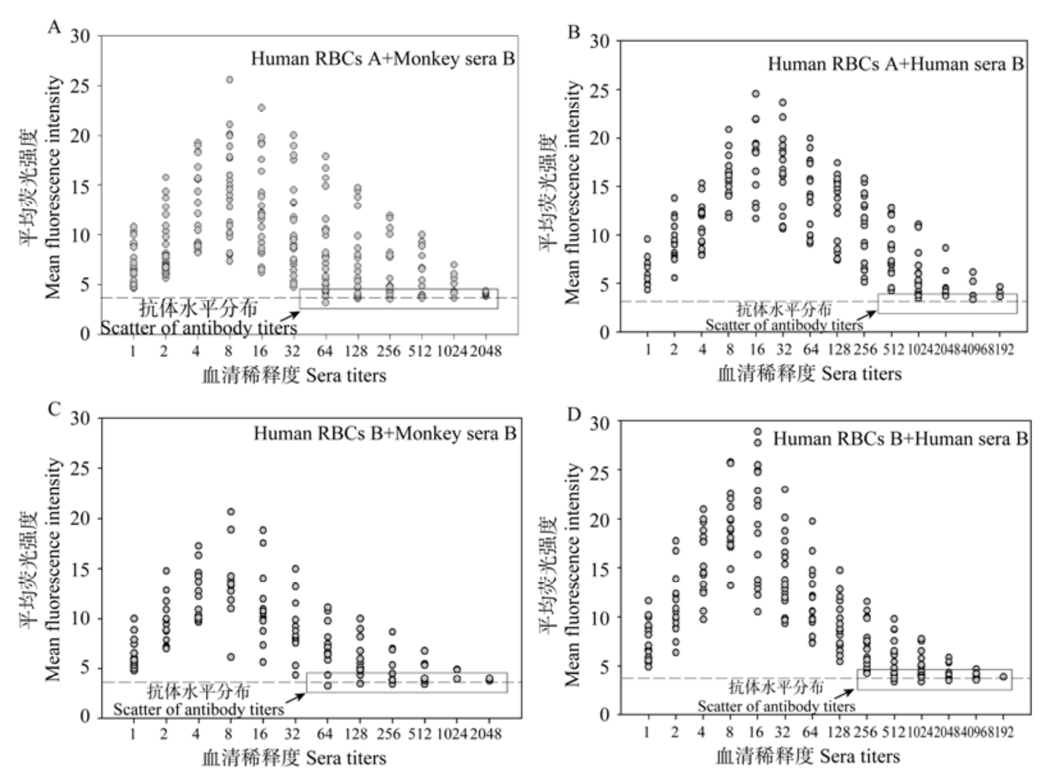


图 4　通过 FCM 法检测的所有收集的猴(猕猴和食蟹猴)和人(健康受试者)血清样本中血型抗体 IgM 水平的分布

Fig. 4　The distributions of anti-A/B IgM antibodies levels in the sera of all the monkey (Rhesus and Cynomolgus monkeys) and human blood samples

A、C：猴血清中抗 A/B 的血型抗体水平主要分布在 1∶64～1∶2 048 之间; B、D：人血清中抗 A/B 的血型抗体水平主要分布在 1∶512～1∶8 192 之间。　A,C: the levels of anti-A/B IgM antibody in monkey sera were ranging from 1∶64 to 1∶2048; B,D: the levels of anti-A/B IgM antibody in human sera were ranging from 1:512 to 1∶8192.

及 25 例猕猴和 24 例食蟹猴的血清样本，在所收集的健康受试者和实验猴的 A 或 B 型血清中针对同批商品化人源 B 或 A 型红细胞的血型抗体滴度分布结果显示，猴血清中血型抗体滴度主要分布在 1∶64 到 1∶2 048 之间(图 4A、C)；而人血清中血型抗体滴度主要分布在 1∶512 到 1∶8 192 之间(图 4B、D)。结果统计比较，猴血清中天然血型抗体的滴度水平明显低于健康人(P<0.05)。表 1 显示了所收集的健康受试者和实验猴的 A 或 B 型血清样本中针对相对应的 B 或 A 型红细胞抗原的血型抗体滴度水平分布及所占各样本总数的比例情况。

表 1 所有猴和人血清样本中抗 A/B 抗体 IgM 滴度的测定结果

Tab.1 Frequency of anti-A/B IgM antibody titers in monkey and human sera

血清稀释度 Sera titers	血清组别 Blood group of sera	
	A	B
猕猴样本数 No. Rhesus	6	14
血清稀释度 Sera titers	anti-B antibody	anti-A antibody
1∶64	1(16.7%)	1(7.1%)
1∶128	0(0%)	3(21.4%)
1∶256	2(33.3%)	3(21.4%)
1∶512	1(16.7%)	4(28.6%)
1∶1 024	1(16.7%)	1(7.1%)
1∶2 048	1(16.7%)	2(14.3%)
食蟹猴样本数 No. cynomolgus	8	12
血清稀释度 Sera titers	anti-B antibody	anti-A antibody
1∶64	0(0%)	1(7.1%)
1∶128	1(12.5%)	3(21.4%)
1∶256	3(37.5%)	2(14.3%)
1∶512	2(25%)	2(14.3%)
1∶1024	1(12.5%)	1(7.1%)
1∶2048	1(12.5%)	3(21.4%)
健康受试者样本数 No. human donors	16	16
血清稀释度 Sera titers	anti-B antibody	anti-A antibody
1∶512	2(12.5%)	0(0%)
1∶1 024	5(31.3%)	6(37.5%)
1∶2 048	4(25%)	5(31.3%)
1∶4 096	4(25%)	2(12.5%)
1∶8 192	1(6.3%)	3(18.8%)

*n (n%)分别代表对应抗 A/B 抗体滴度的例数及所占各分类样本数的比例。

*n (n%) represents the numbers of the anti-A/B antibody titers and the percentages of the titer in the same blood group sera.

3 讨 论

对于血型抗体水平的检测，传统的方法是直接血凝法。该法基于红细胞和相应血清的交叉反应，在以往的临床溶血反应和 ABO 血型不合器官移植中得到广泛应用。然而，血凝法检测的是血型抗体对靶红细胞的总体效应，不能检测出血型抗体的亚型水平，如 IgM 及 IgG 分别的水平，而且这种方法不够精确，可重复性不够令人满意(Rieben et al, 1991, 1992)。基于此，人们尝试改进多种方法，Stussi et al (2005)建立了一种通过流式细胞仪(FCM)来检测人天然血型抗体水平的新方法，能较准确评价血型抗体 IgG 及 IgM 分别的水平，但其采用的靶红细胞需要较为复杂的特殊处理。我们在以往的研究中对 Stussi et al (2005)的 FCM 法加以改进，用于检测人血清中血型抗体的水平，取得了较为满意的检测结果。我们直接使用商品化的人源 ABO 血型悬浮红细胞，避免了采用全血来源的红细胞的凝集造成的检测误差，简化了 FCM 法。并通过与传统的血凝法对比，发现 FCM 法具备较多优势，如能检测到红细胞抗原表位上结合的绝大部分血型抗体，测定的血型抗体水平更灵敏，重复性好，结果更可靠，并且通过间接标记特异的荧光二抗即能快速准确地检测出不同抗体的分型水平。

在本研究中，我们进一步将 FCM 法应用于猴，以期客观准确地评价灵长类动物血清中血型抗体水平及其与正常人的差异。由于猴的红细胞表位极少表达血型抗原，我们也统一使用商品化的人源 ABO 血型悬浮红细胞作为靶细胞，使细胞比例相对恒定且表位具有稳定均一的抗原表达量。对比应用于检测人血清的技术改良之处主要为，预先吸附猴血清中所含的种属间非特异性抗体以尽量避免背景假阳性对检测结果的干扰。结果显示，预处理吸附后，猴血清中针对靶细胞抗原的预存抗体的 IgG 基本降至阴性水平，而 IgM 虽有下降但仍存在一定水平的阳性强度，故我们认为猴血清中血型抗体的类型主要为 IgM。这个发现也与 Terao et al (1988)的研究结果相一致。

在人 ABO 血型不合器官移植临床应用上，受者血清中血型抗体滴度的判定直接影响到不同移植中心 ABO 血型不合移植术的准入标准及免疫吸附方案的具体实施猴 (Tanabe, 2007)。针对猴，我们通过对大量血清标本的不同稀释度检测结果的统计分析得出判定标准，以检测到的 Gmean 值最早接近或达到阴性对照值时的血清稀释度为判定点，实际操作中较为客观准确，且易于判断。

Cooper et al (1989)早期研究表明，在狒狒的ABO 血型不合同种异体心脏移植术后由血型抗体介导的急性体液性排斥例数，占 33%；而 67%为细胞性排斥，较临床人类 ABO 血型不合移植(未经特殊处理)的急性体液性排斥发生率低，推测狒狒血清中预存的血型抗体早期由于血管屏障未能有效的识别组织中的血型抗原或抗体水平不足以介导急性体液性排斥。我们通过对收集的健康受试者和实验猴的血清样本的血型抗体滴度水平检测的结果显示，猴血清中针对红细胞抗原 A 或 B 的血型抗体滴度主要分布在 1∶64 到 1∶2 048 之间，而人血清中血型抗体滴度主要分布在 1∶512 到 1∶8 192 之间，对比得出猴血清中天然血型抗体的滴度水平明显低于健康人。这个实验结果也间接支持了 Cooper et al (1993)和 Galili (2006)所报道的由于灵长类动物血清中预存血型抗体水平不足以介导急性体液性排斥的事实。

在 ABO 血型不合器官移植导致的排斥反应中，受者循环系统中的血型抗体水平发挥关键作用，因此稳定可靠的血型抗体检测技术对于手术全程的抗体监测至关重要。我们建立的改良 FCM 法用于猴血清中血型抗体的检测，结果显示该法较为准确适用，对构建模拟人 ABO 血型不合器官移植术的灵长类动物模型提供了技术保障。预先抽血检测实验猴血清中预存的血型抗体水平即可初步筛选出适用于 ABO 血型不合配对可能发生急性体液性排斥的阳性对照组，也可通过皮下注射血型抗原预先免疫，以特异升高血型抗体水平，从而成功建立灵长类 ABO 血型不合器官移植急性体液性排斥模型(Cooper et al, 1988，1993)，这为进一步模拟临床 ABO 血型不合移植的深入研究提供了良好的灵长类大动物模型。

总之，我们建立了一种准确度和敏感度都更好的 FCM 法来检测猴血清中抗 A 或 B 血型抗体的水平及分型。并通过该技术检测出健康受试者和实验猴血清中血型抗体滴度的具体分布情况。FCM 法可能成为一种标准化和统一化的新技术，并可能逐步替代目前国内外 ABO 血型不合移植所采用的血型抗体监测手段。

参考文献：

Cooper DK, Human PA, Rose AG, Rees J, Keraan M, Reichart B, Du Toit E, Oriol R. 1989.The role of ABO blood group compatibility in heart transplantation between closely related animal species: An experimental study using the vervet monkey to baboon cardiac xenograft model [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **97**(3): 447-455.

Cooper DK, Lexer G, Rose AG, Keraan M, Rees J, Du Toit E, Oriol R. 1988.Cardiac allotransplantation across major blood group barriers in the baboon [J]. *J Med Primatol*, **17**(6): 333-346.

Cooper DK, Ye Y, Niekrasz M, Kehoe M, Martin M, Neethling FA, Kosanke S, DeBault LE, Worsley G, Zuhdi N. 1993. Specific intravenous carbohydrate therapy. A new concept in inhibiting antibody-mediated rejection--experience with ABO-incompatible cardiac allografting in the baboon [J]. *Transplantation*, **56**(4): 769-777.

Doxiadis GG, Otting N, Antunes SG, de Groot NG, Harvey M, Doxiadis II, Jonker M, Bontrop RE. 1998. Characterization of the ABO blood group genes in macaques: evidence for convergent evolution [J]. *Tissue Antigens*, **51**(4 Pt 1): 321-326.

Galili U. 2006.Xenotransplantation and ABO incompatible transplantation: the similarities they share [J]. *Transfus Apher Sci*, **35**(1): 45-58.

Rieben R, Buchs JP, Fluckiger E, Nydegger UE. 1991. Antibodies to histo-blood group substances A and B: Agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy persons of different age categories [J]. *Transfus* (Paris), **31**(7): 607-615.

Rieben R, Frauenfelder A, Nydegger U E. 1992. Naturally occurring ABO antibodies: Long-term stable, individually distinct anti-A IgG spectrotypes [J]. *Eur J Immuno*l, **22**(8): 2129-2133.

Stussi G, Huggel K, Lutz HU, Schanz U, Rieben R, Seebach JD. 2005. Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method [J]. *Br J Haematol*, **130**(6): 954-963.

Tanabe K. 2007. Interinstitutional variation in the measurement of anti-A/B antibodies: the Japanese ABO-Incompatible Transplantation Committee survey [J]. *Transplantation*, **84**(12 Suppl): S13-16.

Terao K, Fujimoto K, Cho F, Honjo S. 1981.Detection of ABO group-specific substances on the red cells of the cynomolgus monkey [J]. *Jpn J Med Sci Biol*, **34**(1): 1-7.

Terao K, Hiyaoka A, Cho F, Honjo S. 1988. The simian-type M and the human-type ABO blood groups in the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*): their inheritance, distribution and significance for the management of a breeding colony [J]. *Lab Anim*, **22**(4): 347-354.